

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 4月 4日
Date of Application:

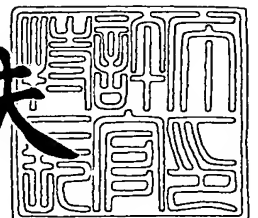
出願番号 特願2003-101346
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-101346]

出願人 オリンパス株式会社
Applicant(s):

2004年 3月10日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3018571



【書類名】 特許願

【整理番号】 03P00963

【提出日】 平成15年 4月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G02B 21/00
G02B 21/06
G01N 37/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 青野 寧

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 望月 剛

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 長 和彦

【特許出願人】

【識別番号】 000000376

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2丁目 4 3 番 2 号

【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【代表者】 菊川 剛

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002314

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1



【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書
【発明の名称】 全反射蛍光顕微鏡
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標本からの光を取り込む対物レンズと、
前記対物レンズに取り込んだ光を結像レンズを介して撮像素子に集光させる観察光路と、

前記標本を挟んで前記対物レンズと対向する位置に配置された、全反射照明が可能な開口数を有する透過照明用のコンデンサレンズと、

前記コンデンサレンズより光源側の透過照明光路の最外部近傍で移動可能に保持され、前記コンデンサレンズ側にレーザ光を反射導入する反射ミラーと、

前記反射ミラーに対して前記透過照明光路に略直交な方向から前記レーザ光を入射するレーザ導入光路と、

前記反射ミラーを前記レーザ導入光路と平行な方向に移動する移動手段とを具備し、

前記レーザ導入光路は、

前記レーザ光をレーザ発振器から導くためのファイバと、

前記ファイバの出射端からの発散光線を収束光線に変換し、前記反射ミラーを介して前記コンデンサレンズの前側焦点位置近傍に集光させる投光レンズ部と、を具備したことを特徴とする全反射蛍光顕微鏡。

【請求項 2】

前記レーザ導入光路は、

前記ファイバの出射端と前記投光レンズ部との間に一体的に挿脱可能に配置されたコンバージョンレンズユニット
を更に備えており、

該レーザ導入光路に対して一体的に挿脱することで前記レーザ光の集光位置を変えずに集光位置への入射 NA を変換することを特徴とする請求項 1 記載の全反射蛍光顕微鏡。

【請求項 3】

前記対物レンズは、

観察倍率が異なる複数の選択的に前記観察光路上に配置可能なように構成されており、

前記対物レンズの倍率選択に応じて前記レーザ導入光路に対して前記コンバージョンレンズユニットの挿脱を選択する制御手段
を更に備えたことを特徴とする請求項 2 記載の全反射蛍光顕微鏡。

【請求項 4】

前記レーザ導入光路は、

前記ファイバの出射端と前記投光レンズ部との間にその光軸方向に沿って個別に移動可能に配置されたレンズ群からなるズームレンズユニット
を更に備えており、

該ズームレンズユニットを構成するレンズ群の各々の光軸方向の位置関係を変換することで前記レーザ光の集光位置を変えずに集光位置への入射 NA を連続的に変換する

ことを特徴とする請求項 1 記載の全反射蛍光顕微鏡。

【請求項 5】

前記対物レンズは、

観察倍率が異なる複数の選択的に前記観察光路上に配置可能なように構成されており、

前記対物レンズの倍率選択に応じて前記ズームレンズユニットを構成するレンズ群の各々の光軸方向の相対的な位置関係を決定する制御手段
を更に備えたことを特徴とする請求項 4 記載の全反射蛍光顕微鏡。

【請求項 6】

標本からの光を取り込む対物レンズと、

前記対物レンズに取り込んだ光を結像レンズを介して撮像素子に集光させる観察光路と、

前記観察光路上の任意の位置に配置され、該観察光路を光学特性に依存して分割する単一または複数の分割手段と、

前記標本を挟んで前記対物レンズと対向する位置に配置された、全反射照明が

可能な開口数を有する透過照明用のコンデンサレンズと、

前記コンデンサレンズより光源側の透過照明光路の最外部近傍で移動可能に保持され、前記コンデンサレンズ側にレーザ光を反射導入する反射ミラーと、

前記反射ミラーに対して前記透過照明光路に略直交な方向から前記レーザ光を入射するレーザ導入光路と、

前記反射ミラーを前記レーザ導入光路と平行な方向に移動する移動手段とを具備し、

前記レーザ導入光路は、

前記レーザ光をレーザ発振器から導くためのファイバと、

前記ファイバの出射端からの発散光線を収束光線に変換し、前記反射ミラーを介して前記コンデンサレンズの前側焦点位置近傍に集光させる投光レンズ部とを具備し、

前記反射ミラー、移動手段及びレーザ導入光路を一組とするレーザ導入部は、前記透過照明光路を中心に、且つ前記透過照明光路の光軸に対して略直交する方向に放射状に複数配置されることを特徴とする全反射蛍光顕微鏡。

【請求項 7】

前記単一または複数の分割手段により分割された複数の観察光路において、各々の光路長を伸縮する光路長調整部を更に具備したことを特徴とする請求項 6 記載の全反射蛍光顕微鏡。

【請求項 8】

前記全反射蛍光顕微鏡は、各々の撮像素子の像及び前記光路長調整部による光路長の伸縮量を演算処理する演算処理部を更に具備したことを特徴とする請求項 7 記載の全反射蛍光顕微鏡。

【請求項 9】

前記複数のレーザ導入部の各々において、前記レーザ光の導入および遮断を選択するためのシャッタを更に具備すると共に、各々のシャッタの開閉を制御することで導入される前記レーザ光を取捨選択す

る導入レーザ選択手段

を更に具備した

ことを特徴とする請求項 7 又は 8 記載の全反射蛍光顕微鏡。

【請求項 1 0】

前記複数のレーザ導入部のうち、少なくとも 2 つのレーザ光の波長が同一である

ことを特徴とする請求項 9 記載の全反射蛍光顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1】

【発明が属する技術分野】

本発明は、全反射照明により発生するエバネッセント光を用いて蛍光観察を行うための全反射蛍光顕微鏡に関するものである。

【 0 0 0 2】

【従来の技術】

近年、生物顕微鏡の蛍光観察方法を用いた顕微鏡として、全反射蛍光顕微鏡（TIRFM：Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy）と呼ばれる顕微鏡が注目されている。これは、カバーガラスと標本の境界面で照明光を全反射させた時に、標本側に数100nm以下のわずかな範囲に浸み出すエバネッセント光と呼ばれる光を用いて蛍光物質を励起する方法であり、カバーガラス近傍のわずかな範囲の蛍光だけが観察される。この方法によれば、バックグラウンドが非常に暗く、コントラストの高い蛍光観察や微弱な蛍光の観察が可能である。

【 0 0 0 3】

ところで、全反射蛍光顕微鏡（以下、TIRFMと称する）を用いた生物研究の現場においては、カバーガラスと標本の境界面近傍のより浅い面内をコントラスト良く観察したい場合も有れば、ある程度の深さまでエバネッセント光による照明光を届かせて広範囲の観察をしたい場合も有る。従って、観察対象に応じてエバネッセント光の浸み出し深さが変えられるようになっている事が望ましい。

【 0 0 0 4】

境界面からのエバネッセント光の浸み出し深さは、D.Axelrodの論文「Total I

「Internal Reflection Fluorescence at Biological Surfaces」において開示されており、以下の公式が成り立つ。

$$d = \lambda / 4 \pi \sqrt{(n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2)} \quad (1)$$

d : エバネッセント光の浸み出し深さ、

λ : 光の波長、

n_1 : 入射側屈折率、

θ_1 : 入射角、

n_2 : 出射側屈折率、

従って、境界面に対する照明光の入射角、すなわち境界面の垂線に対する照明光の傾射角が大きい程、エバネッセント光の浸み出し深さは浅くなる。実際のTIRFMでは、照明光の入射角を揃えるために、コヒーレント性の高いレーザ光が使用され、境界面へのレーザ光の入射角を変えることで、エバネッセント光の浸み出し深さを調整できるようになっている。

【0005】

図16は特許文献1において開示されたTIRFMの構造を示すものである。ここでは、全反射照明が可能な開口数を有する対物レンズ104を用い、照明光として用いているレーザ光106を対物レンズ104側へ反射するミラー107を、対物レンズ104の光軸に対して直交する方向に図16(a) → (b) → (c)のように移動させる。ミラー107を移動させると、対物レンズ104の光軸から離れる方向へレーザ光106の対物レンズ104への入射位置が移動するので、対物レンズ104からカバーガラス102と標本101との境界面に向けて出射されるレーザ光106の入射角度が変化し、対物レンズ104を出射したレーザ光106は、イメージンオイル102を介して図16(c)のようにカバーガラス102と標本101との境界面で全反射される。

【0006】

また、図17は特許文献2において開示されたTIRFMの構造を示すものである。ここでは、透過照明用コンデンサの先玉レンズ261の側面261aからレーザ光106を入射することで全反射照明を可能としている。

【0007】

また、カバーガラス 102 と標本 101 との境界面と観察光軸の交点を中心としてレーザ照明装置自体 150 を TIRFM の構造を備えた顕微鏡装置 160 に対して回転させることでカバーガラス 102 と標本 101 との境界面とレーザ光 106 との角度を変化させている。

【0008】

【特許文献 1】

特許第 3093145 号公報（【0002】～【0021】、【図 1】～【図 4】参照）

【0009】

【特許文献 2】

特開 2001-013413 号公報（【0014】～【0051】、【図 1】～【図 3】参照）

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

ところで、カバーガラス 102 と標本 101 の境界面で照明光としてのレーザ光 106 を全反射させるためには、レーザ光 106 の入射角を全反射が起こる臨界角以上に傾ける必要が有る。ここで、カバーガラス 102 と標本 101 の境界面を挟むカバーガラス 102 側の屈折率を n_1 、標本 101 側の屈折率を n_2 とした場合、臨界角 θ_c は次の(2)式で表される。

$$\sin \theta_c = n_2 / n_1 \quad (2)$$

従って、全反射照明を実現させるための入射角 θ_1 の条件は次の(3)式のようになる。

$$n_1 \sin \theta_1 > n_2 \quad (3)$$

一方、図 16 に示した特許文献 1 のように、対物レンズ 104 を通るレーザ光 106 の入射光を傾ける場合、設定可能な最大入射角 θ_{max} は、対物レンズ 104 の NA（開口数）に依存し、次の(4)式で表される。

$$n_1 \sin \theta_{max} = NA \quad (4)$$

したがって、本構成を成立させるための条件は、対物レンズの NA が、標本側の屈折率 n_2 よりも大きいことが必要である。

【0011】

一般に、生物細胞の屈折率は1.37~1.38程度であるので、使用する対物レンズのNAは、最低でも1.4程度が必要である。

ところが、現在のところ1.4以上のNAを有する対物レンズは、60倍以上の高倍率に限定されている。これは、低倍の対物レンズで高NAを実現するためには、対物レンズの有効径を大きくする必要があるが、対物レンズの取付けネジ径の規格値を保ったままでこれを実現することが困難なためである。従って、図16の構成では20倍、40倍程度の倍率での全反射蛍光観察は不可能である。

【0012】

これに対し、図17に示した特許文献2のように、透過照明用のコンデンサ側からレーザ光106を入射するようにすれば、照明範囲は対物レンズ104に依存せずに設定することができるので、低倍の対物レンズを用いた全反射蛍光観察が可能となる。

【0013】

しかしこの構成では、透過照明用コンデンサの先玉レンズ261の真横にレーザ照明装置150が配置されており、しかもレーザ照明装置150自体が回転する必要があるため、回転機構の保持部や回転するレーザ照明装置150の軌跡の空間を含めてかなりのスペースが必要であり、標本のスペースを圧迫し、作業性を著しく損なうことが考えられる。

【0014】

また、低倍対物レンズの観察範囲を照明可能なようにレーザ光照射範囲を設定すると、高倍対物レンズで観察する場合には、レーザ光照射範囲の一部のみを観察することになるため、他の部分に照射されているレーザ光は無駄になってしまう。標本面におけるレーザ光のエネルギー密度は照射面積に反比例するので、高倍対物レンズで観察する場合には、観察に必要な範囲のみを照明するようにレーザ光照射範囲を凝縮し、レーザ光のエネルギー密度を向上することが可能である事が好ましい。

【0015】

特に、単一分子の検出等、非常に微弱な蛍光の検出を目的とする実験において

は、レーザ光の照射エネルギー密度を可能な限り高くできることが求められる。また一方で、TIRFMが生物研究の現場に普及した最近においては、エバネッセント光の浸み出し深さが変えられる、という段階から更に進んで、複数の任意の波長を同時に、しかも各々を任意の深さで照明できることへの要求が出始めている。

【0 0 1 6】

この背景には、G F P等の蛍光蛋白の改良が進み、生きた細胞の動態観察や機能観察を多色蛍光で行うことが容易になったこと、また、前述のAxelrodの公式(1)からも分かるように、エバネッセント光の浸み出し深さは光の波長にも依存するため、同じレーザ光入射角でも波長が異なれば見えている範囲は異なるという原理的な問題と、各々の波長に対応する細胞内組織の深さ位置が異なるという現実的な問題が有る。

【0 0 1 7】

従来のTIRFMにおいて、機械的手段やモータ等の電氣的駆動手段を用いてレーザ光の入射角度や波長を高速で切り換えることは可能であるが、速い現象を追う場合等、厳密な意味での同時性が必要な場合において、高速切換での対応には限界が有る。このようなケースでは、レーザ光の導入部を複数箇所に向けて同時に照明を行うことが必要となる。

【0 0 1 8】

しかし、図16に示した特許文献1において開示されたTIRFMでは、照明光を対物レンズ側へ反射すると共に蛍光を観察側へ透過する為に、ダイクロイックミラーが用いられる。

【0 0 1 9】

ところが照明する波長が複数になると、ダイクロイックミラーはそれに対応したマルチバンドの波長特性を有していることが必要になる。マルチバンドのダイクロイックミラーは製造の難度が高く、高価な一方、波長の分離レベルが悪く、蛍光像の明るさやS N比を劣化させる。また、途中から更に照明波長を増やしたい場合には、ダイクロイックミラーを一から作り直す必要が有る。

【0 0 2 0】

一方、ダイクロイックミラーを使わないために、図18のように対物レンズ104の瞳の最外部の位置に全反射ミラー108aを配置することは可能だが、標本101との境界面で全反射したレーザ光106を観察側に通さないために反対側の最外部にも全反射ミラー108bを配置する必要がある。

【0021】

従って、本来観察用に100%使用できる筈であった対物レンズ104の瞳のかなりの部分を全反射ミラー108a, bによって失うことになり、対物レンズの性能を劣化させることになる。

【0022】

また、図17に示した特許文献2において開示されたTIRFMでは、先に述べたように、透過照明用コンデンサの先玉レンズ261の真横にレーザ照明装置150が配置されており、しかもレーザ照明装置150自体が回転する必要があるため、回転機構の保持部や回転するレーザ照明装置150の軌跡の空間を含めてかなりのスペースが必要である。この構成では、独立したレーザ光の出射角度調整部を持つレーザ照明装置の配置は左右2つが精一杯である。

【0023】

また、従来のTIRFMにおける共通の課題として、複数の波長を異なる深さのエバネッセント光で観察する場合、例えばB励起で浅い領域を観察し、G励起で深い領域を観察するとしたら、B励起とG励起を同時観察できるのは浅い領域のみであり、その場合G励起の像はデフォーカスした背景像として観察できるだけで、例えば細胞膜全体を染めて細胞の大体の大きさを把握する手段等の限られた用途でしか使用することが出来なかった。

【0024】

対物レンズを固定したままで、異なる深さの面を同時に観察することが出来れば、細胞膜近傍と細胞内部の小器官の形態の同時観察等、多波長TIRFMの用途を更に広げることが可能となる。

【0025】

本発明は上記に述べたような課題に鑑みて成されたものであり、60倍よりも低い観察倍率の対物レンズにおける全反射蛍光観察を可能にすると共に、コンパ

クトで標本の操作スペースを圧迫しない優れた作業性を有する全反射蛍光顕微鏡を提供することを目的とする。

【0 0 2 6】

また、異なる倍率の対物レンズの観察範囲に合わせてレーザ光照射範囲を変換できる全反射蛍光顕微鏡を提供することを目的とする。

また、レーザ光の導入部を複数構成することで、異なる波長、異なる浸み出し深さのエバネッセント光を同時に照射できる全反射蛍光顕微鏡を提供することを目的とする。

【0 0 2 7】

また、照明に異なる深さのエバネッセント光を組み合わせて、異なる深さの面を高いコントラストで同時に蛍光観察ができる全反射蛍光顕微鏡を提供することを目的とする。

【0 0 2 8】

【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成するための本発明の請求項 1 の全反射蛍光顕微鏡は、標本からの光を取り込む対物レンズと、前記対物レンズに取り込んだ光を結像レンズを介して撮像素子に集光させる観察光路と、前記標本を挟んで前記対物レンズと対向する位置に配置された、全反射照明が可能な開口数を有する透過照明用のコンデンサレンズと、前記コンデンサレンズより光源側の透過照明光路の最外部近傍で移動可能に保持され、前記コンデンサレンズ側にレーザ光を反射導入する反射ミラーと、前記反射ミラーに対して前記透過照明光路に略直交な方向から前記レーザ光を入射するレーザ導入光路と、前記反射ミラーを前記レーザ導入光路と平行な方向に移動する移動手段とを具備し、前記レーザ導入光路は、前記レーザ光をレーザ発振器から導くためのファイバと、前記ファイバの出射端からの発散光線を収束光線に変換し、前記反射ミラーを介して前記コンデンサレンズの前側焦点位置近傍に集光させる投光レンズ部と、を具備したことを特徴とするものである。

【0 0 2 9】

また、本発明の請求項 2 は、請求項 1 の前記レーザ導入光路が、前記ファイバ

の出射端と前記投光レンズ部との間に一体的に挿脱可能に配置されたコンバージョンレンズユニットを更に備えており、該レーザ導入光路に対して一体的に挿脱することで前記レーザ光の集光位置を変えずに集光位置への入射NAを変換することを特徴とするものである。

【0030】

また、本発明の請求項3は、請求項2の前記対物レンズが、観察倍率が異なる複数の選択的に前記観察光路上に配置可能なように構成されており、前記対物レンズの倍率選択に応じて前記レーザ導入光路に対して前記コンバージョンレンズユニットの挿脱を選択する制御手段を更に備えたことを特徴とするものである。

【0031】

また、本発明の請求項4は、請求項1の前記レーザ導入光路が、前記ファイバの出射端と前記投光レンズ部との間にその光軸方向に沿って個別に移動可能に配置されたレンズ群からなるズームレンズユニットを更に備えており、該ズームレンズユニットを構成するレンズ群の各々の光軸方向の位置関係を変換することで前記レーザ光の集光位置を変えずに集光位置への入射NAを連続的に変換することを特徴とするものである。

【0032】

また、本発明の請求項5は、請求項4の前記対物レンズが、観察倍率が異なる複数の選択的に前記観察光路上に配置可能なように構成されており、前記対物レンズの倍率選択に応じて前記ズームレンズユニットを構成するレンズ群の各々の光軸方向の相対的な位置関係を決定する制御手段を更に備えたことを特徴とするものである。

【0033】

また、本発明の請求項6の全反射蛍光顕微鏡は、標本からの光を取り込む対物レンズと、前記対物レンズに取り込んだ光を結像レンズを介して撮像素子に集光させる観察光路と、前記観察光路上の任意の位置に配置され、該観察光路を光学特性に依存して分割する単一または複数の分割手段と、前記標本を挟んで前記対物レンズと対向する位置に配置された、全反射照明が可能な開口数を有する透過照明用のコンデンサレンズと、前記コンデンサレンズより光源側の透過照明光路

の最外部近傍で移動可能に保持され、前記コンデンサレンズ側にレーザ光を反射導入する反射ミラーと、前記反射ミラーに対して前記透過照明光路に略直交な方向から前記レーザ光を入射するレーザ導入光路と、前記反射ミラーを前記レーザ導入光路と平行な方向に移動する移動手段とを具備し、前記レーザ導入光路は、前記レーザ光をレーザ発振器から導くためのファイバと、前記ファイバの出射端からの発散光線を収束光線に変換し、前記反射ミラーを介して前記コンデンサレンズの前側焦点位置近傍に集光させる投光レンズ部とを具備し、前記反射ミラー、移動手段及びレーザ導入光路を一組とするレーザ導入部は、前記透過照明光路を中心に、且つ前記透過照明光路の光軸に対して略直交する方向に放射状に複数配置させることを特徴とするものである。

【 0 0 3 4 】

また、本発明の請求項 7 は、請求項 6 の前記単一または複数の分割手段により分割された複数の観察光路において、各々の光路長を伸縮する光路長調整部を更に具備したことを特徴とするものである。

【 0 0 3 5 】

また、本発明の請求項 8 は、請求項 7 記載の前記全反射蛍光顕微鏡が、各々の撮像素子の像及び前記光路長調整部による光路長の伸縮量を演算処理する演算処理部を更に具備したことを特徴とするものである。

【 0 0 3 6 】

また、本発明の請求項 9 は、請求項 7 又は 8 記載の前記複数のレーザ導入部の各々において、前記レーザ光の導入および遮断を選択するためのシャッタを更に具備すると共に、各々のシャッタの開閉を制御することで導入される前記レーザ光を取捨選択する導入レーザ選択手段を更に具備したことを特徴とするものである。

【 0 0 3 7 】

また、本発明の請求項 1 0 は、請求項 9 記載の前記複数のレーザ導入部のうち、少なくとも 2 つのレーザ光の波長が同一であることを特徴とするものである。

次に、上記の発明による作用を説明する。

【 0 0 3 8 】

本発明の請求項 1 の全反射蛍光顕微鏡によれば、コンデンサレンズの開口数により全反射照明が可能であるので、対物レンズの開口数や倍率に関わらず全反射照明による蛍光観察が可能となる。また、レーザ導入光路は、標本から見てコンデンサレンズより遠くの位置で構成されており、標本の近くのスペースを圧迫しない。また、構造が単純で動作範囲も狭いため、装置自体がコンパクトになる。

【0039】

本発明の請求項 2 の全反射蛍光顕微鏡によれば、コンバージョンレンズユニットをレーザ導入光路に挿脱することにより、コンデンサレンズの前側焦点位置近傍への入射 NA が変換され、その結果、標本におけるレーザ光照射範囲ひいてはエネルギー密度が変換される。

【0040】

本発明の請求項 3 の全反射蛍光顕微鏡によれば、対物レンズの観察倍率を切り換えた時に、それに連動して観察範囲に対応したレーザ光照射範囲への切換が制御手段によって選択されコンバージョンレンズユニットを挿脱される。

【0041】

本発明の請求項 4 の全反射蛍光顕微鏡によれば、コンデンサレンズの前側焦点位置近傍への入射 NA を連続的に変換することで、標本におけるレーザ光照射範囲ひいてはエネルギー密度が連続的に変換される。

【0042】

本発明の請求項 5 の全反射蛍光顕微鏡によれば、対物レンズの観察倍率を任意に切り換えた時に、その観察範囲に対応して自由に設定されたレーザ光照射範囲への切換が連動して行われる。

【0043】

本発明の請求項 6 の全反射蛍光顕微鏡によれば、コンデンサレンズの開口数により全反射照明が可能であるので、対物レンズの開口数や倍率に関わらず全反射照明による蛍光観察が可能となる。また、レーザ導入光路は、標本から見てコンデンサレンズより遠くの位置で構成されており、標本の近くのスペースを圧迫しない。また、構造が単純で動作範囲も狭いため、装置自体がコンパクトになる。また、複数個による構成や増設が容易であり、複数の波長のレーザ光を用いて、

各々独立してエバネッセント光の浸み出し深さを設定し、同時に照射することが可能となる。

【0044】

本発明の請求項7の全反射蛍光顕微鏡によれば、対物レンズの焦点位置を固定したままで、標本上の異なる深さの面を、全反射照明による高いコントラストで同時観察することが可能となる。

【0045】

本発明の請求項8の全反射蛍光顕微鏡によれば、各々の撮像素子の像及び光路長調整部による光路長の伸縮量を演算処理部の演算処理により調整することが可能となる。

【0046】

本発明の請求項9の全反射蛍光顕微鏡によれば、標本に導入されるレーザ光をシャッタの開閉により取捨選択することが可能となる。

本発明の請求項10の全反射蛍光顕微鏡によれば、レーザ光の波長を同一に設定したレーザ導入部同士において、各々の浸み出し深さを変えてシャッタの開閉により交互に照明することにより、同じ蛍光物質の浸み出し深さの違いによる観察像を比較することで、その蛍光の発生源の深さを特定することが可能となる。

【0047】

【発明の実施の形態】

(第1実施形態) 図1は本発明の第1実施形態の構成を示したものである。

以下、図1において、1は顕微鏡のコンデンサレンズであり、2はコンデンサレンズ1の先端に点着されたイマージョンオイルであり、3は観察用のスライドガラスであり、4はスライドガラス3上におかれた標本である。また、5は標本4を挟んでスライドガラス3の反対側にあるカバーガラスであり、6はカバーガラス5を通して標本4を観察する対物レンズである。

【0048】

ここで、コンデンサレンズ1のNA（開口数）は、標本4の屈折率よりも大きくなるように設計されている。すなわち、イマージョンオイル2及びスライドガラス3の屈折率を n_1 、標本4の屈折率を n_2 とした場合、先に示した(3)

、(4)式から、次の関係が成り立つ。

$$NA = n_1 \sin \theta_{\max} > n_2 \quad (5)$$

ここで、 θ_{\max} は、コンデンサレンズ1からイマージョンオイル2及びスライドガラス3を通して入射できる最大入射角に相当する。また、一般に生物細胞の屈折率は1.37～1.38程度であるため、コンデンサレンズ1の開口数はこれより大きい値、具体的には1.65～1.45程度を有するものとする。

【0049】

一方、7は透過照明光源であり、8は透過照明光源7からの光をコンデンサレンズ1に導入するコレクタレンズである。9はコンデンサレンズ1から透過照明光源7に至る透過照明光路Tの途中に配置された反射ミラーである。

【0050】

ここで反射ミラー9は、コンデンサレンズ1の開口径の最も外側近傍に配置されており、且つ透過照明光路Tに対して略直交する方向から導入される光を略直交の角度で反射するように配置されている。10は反射ミラー9を透過照明光路Tと略直交な方向に移動可能に保持するミラー保持部であり、11はミラー保持部10に当接されたマイクロメータヘッドであり、12は引っ張り力によりマイクロメータヘッド11をミラー保持部10に当接維持させるバネであり、13は回転によりマイクロメータヘッド11を直動するマイクロメータ操作部である。

【0051】

ここで、マイクロメータヘッド11の直動方向は透過照明光路Tと略直交な方向に一致しており、従って反射ミラー9はマイクロメータ操作部13を回転することで透過照明光路Tと略直交な方向に直動する。

【0052】

一方、14はレーザ発振器であり、15はレーザ発振器14から発振されたレーザ光を導入するファイバ、好ましくはシングルモードファイバであり、16はレーザ光を発散光線として出射するファイバ出射端であり、17はファイバ出射端16からの発散光線を収束光線に変換し、反射ミラー9を介してコンデンサレンズ1の前側焦点位置近傍に集光させる集光レンズである。前記9から数字順に17までの要素は1まとまりのレーザ導入部L1として成立しており、ベース1

8 上において顕微鏡に固定される。

【0053】

なお、レーザ導入部 L 1 から透過照明光路 T に導入されるレーザ光の波長、すなわちレーザ発振器 14 の発振波長は、単波長の λ L 1 であるとする。

一方、対物レンズ 6 から出射した観察光路上には結像レンズ 22 が配置され、その延長上には吸収フィルタ 24 が配置され、その延長上の結像レンズ 22 の焦点位置には撮像素子 25 が配置される。吸収フィルタ 24 は、波長 λ L 1 より長い特定の波長帯 λ E 1 のみを透過するバンドパスフィルタである。

【0054】

次に、本実施形態の構成の作用について述べる。

レーザ発振器 14 から発振された波長 λ L 1 のレーザ光は、ファイバ 15 に導入され、ファイバ出射端 16 から発散光線として出射され、集光レンズ 17 を通って収束光線に変換され、反射ミラー 9 によって透過照明光路 T の最も外側近傍の位置でコンデンサレンズ 1 側に反射される。レーザ光は、コンデンサレンズ 1 の前側焦点位置近傍で一旦集光された後、コンデンサレンズ 1 を通って、斜め方向に進む平行光線としてコンデンサレンズ 1 から出射され、イメージンオイル 2 を介してスライドガラス 3 と標本 4 との境界面に入射する。

【0055】

ここで、スライドガラス 3 と標本 4 との境界面への入射角 θ L 1 が全反射の臨界角より大きければ、レーザ光は境界面で全反射し、標本 4 側にエバネッセント光が浸み出す。標本 4 中に存在する特定の蛍光物質は、波長 λ L 1 のエバネッセント光により励起され、蛍光の最大輝度波長が吸収フィルタ 24 の透過波長帯 λ E 1 の中に有るような蛍光を発する。蛍光はカバーガラス 5 を通って対物レンズ 6 に入り、結像レンズ 22 および吸収フィルタ 24 を透過し、波長帯 λ E 1 の蛍光像が撮像素子 25 で撮像される。

【0056】

一方で、前述したように、マイクロメータ操作部 13 を回転することで透過照明光路 T に略直交する方向に反射ミラー 9 を直動する。反射ミラー 9 の位置が透過照明光路 T に略直交する方向に移動すると、前述のレーザ光が反射した後のコ

ンデンサレンズ 1 への入射位置が移動し、コンデンサレンズ 1 からの出射角度、ひいてはスライドガラス 3 と標本 4 との境界面への入射角 θ L 1 が変わる。

【0057】

既に述べたように、全反射照明におけるエバネッセント光の浸み出し深さは境界面への光の入射角によって変わるので、マイクロメータ操作部 13 を回転して反射ミラー 9 を透過照明光路 T の光軸に対して近づけたり遠ざけたりと微小移動させることで、エバネッセント光の浸み出し深さ d L 1 を任意に変化させることができる。透過照明光源 7 からの光を用いた透過照明観察を行う時には、反射ミラー 9 を透過照明光路 T から完全に退避させることができるものとする。

【0058】

以上に述べたような本発明の第 1 実施形態の構成及び作用によれば、レーザ光の最大入射角 θ_{max} は(5)式で示したコンデンサレンズ 1 の NA のみに依存するので、対物レンズ 6 の NA や倍率に関わらず全反射照明による蛍光観察が可能である。

【0059】

また、レーザ導入部 L 1 は、標本 4 から見てコンデンサレンズ 1 より遠くの位置で構成されており、標本 4 の近くのスペースを圧迫しない。また、構造が単純で動作範囲も狭いため、装置自体をコンパクトにでき、優れた作業性を有する全反射顕微鏡とすることができる。

(変形例) 以上、図 1 を用いて本発明の第 1 実施形態について説明したが、スライドガラス 3 の代わりに、ガラスボトムディッシュを用いて、カバーガラス 5 を除外しても良い。この場合には、対物レンズ 6 は作動距離が短い場合には液浸対物レンズを用いる。

【0060】

また、反射ミラー 9 の移動手段はマイクロメータに限らず、例えば電動モータやピエゾアクチュエータ等を用いても良い。

また、反射ミラー 9 を固定し、ファイバ出射端 16 および集光レンズ 17 を透過照明光路 T の光軸と平行な方向に一体的に移動させる構成によっても、本実施形態と同様の作用を得られる。この場合においても、移動手段はマイクロメータ

、電動モータおよびピエゾアクチュエータ等を用いて構成することができる。

【0061】

また、上述した実施形態は正立型顕微鏡に適用していたが、これに限られるものではなく、構成を上下反転して、倒立顕微鏡において構成することも可能である。

【0062】

また、観察光路上の構成は、レーザ導入部 L1 の励起波長に対する蛍光波長を選別して撮像できる手段であれば、本実施形態に述べたような構成に限定されず、自由に構成することが可能である。

【0063】

また、上述した実施形態では、ファイバ出射端 16 から出射されるレーザ光が発散光線であるため、単一の集光レンズ 17 により収束光線に変換し、反射ミラー 9 を介してコンデンサレンズ 1 の前側焦点位置近傍に集光させるようにしていたが、これに限られるものではなく、例えば、ファイバ出射端 16 から出射されるレーザ光を単一若しくは複数のレンズで平行光束に変換し、反射ミラー 9 を介してコンデンサレンズ 1 の前側焦点位置近傍に入射するまでに別に設けた集光レンズで集光することもできる。

(第2実施形態) 図2は本発明の第2実施形態の構成を示したものであり、図1と同一の構成要素には同一の符号を付けて説明を省略する。

【0064】

以下、図2において、19はファイバ出射端16と集光レンズ17との間に、レーザ導入光路に対して一体的に挿脱可能に配置されたコンバージョンレンズユニットである。ここで、図3は本実施形態におけるコンバージョンレンズユニット19の構成と配置を説明するために、図2の構成を上から見た部分拡大図である。

【0065】

以下、図3において、19aはファイバ出射端16からの発散レーザ光のNAを変換する凸レンズであり、19bはNA変換されたレーザ光を、集光レンズ17を通してコンデンサレンズ1の前側焦点位置近傍に集光させるように焦点距離

を調整する凹レンズである。20はコンバージョンレンズユニット19をレーザ導入光路に挿脱するためのノブである。ここでは、ノブ20を図3(a)から図3(b)のように引き出すとコンバージョンレンズユニット19がレーザ導入光路から外れ、ノブ20を押し込むとコンバージョンレンズユニット19がレーザ導入光路に挿入される。

【0066】

次に、本実施形態の構成の作用について述べる。

ノブ20を押し込んでコンバージョンレンズユニット19がレーザ導入光路に挿入されると、ファイバ出射端16からの発散光（レーザ光）は、凸レンズ19aによってNAを変換され、凹レンズ19bおよび集光レンズ17を通ることでコンデンサレンズ1の前側焦点位置近傍に集光される。この時の入射NAは、凸レンズ19aおよび凹レンズ19bがレーザ導入光路から外れている時に比べて小さい入射NAでコンデンサレンズ1の前側焦点位置近傍に集光される。

【0067】

その結果、コンデンサレンズ1を通った後の斜め方向に進む平行光線の光線束径、すなわち標本4におけるレーザ光照射範囲は凝縮され、レーザ光のエネルギー密度が高くなる。

【0068】

以上に述べたような本発明の第2実施形態の構成及び作用によれば、コンバージョンレンズユニット19をレーザ導入光路に挿脱することにより、標本4におけるレーザ光照射範囲ひいてはエネルギー密度を変換することができる。このことにより、強いパワーで微弱蛍光を検出したい場合にはコンバージョンレンズユニット19をレーザ導入光路に挿入し、広い範囲を蛍光観察したい場合にはコンバージョンレンズユニット19をレーザ導入光路から外す、といった様な、用途に応じた使い分けが可能となる。

（変形例）以上、本発明の第2実施形態について説明したが、コンバージョンレンズユニット19の挿脱手段はノブに限定されず、例えば電動モータ等によっても良く、自由に構成することが可能である。

【0069】

また、上述した実施形態では、図3に示すようにコンバージョンレンズユニット19は、ファイバ出射端16からの発散レーザ光のNAを変換する凸レンズ19aと、NA変換されたレーザ光を集光レンズ17を通してコンデンサレンズ1の前側焦点位置近傍に集光させるように焦点距離を調整する凹レンズ19bとから構成されているとしたが、同一の作用を得られる凸レンズと凸レンズとの組み合わせであっても良い。

【0070】

また、上述した実施形態では、コンバージョンレンズユニット19は、一種類のユニットをファイバ出射端16と集光レンズ17との間で挿脱するように構成していたが、これに限られるものではなく、例えば、異なる入射NAに変換するコンバージョンレンズユニット19をファイバ出射端16と集光レンズ17との間で選択的に挿脱できるようにしてもよく、このような構成にすれば、標本に3通り以上の異なる入射NAのレーザ光を照射することができ、より細かいレーザ光の照射範囲、ひいてはエネルギー密度の調整ができる。

(第3実施形態) 図4および図5は本発明の第3実施形態の構成を示したものであり、図2、3と同一の構成要素には同一の符号を付けて説明を省略する。

【0071】

以下、図4において、61は高倍観察用対物レンズであり、62は低倍観察用対物レンズである。ここで、コンバージョンレンズユニット19をレーザ導入光路に挿入した状態でのレーザ光照射範囲は高倍観察用対物レンズ61による観察範囲と略一致するように設定されており、且つコンバージョンレンズユニット19をレーザ導入光路から外した状態でのレーザ光照射範囲は低倍観察用対物レンズ62による観察範囲と略一致するように設定されている。

【0072】

また、図5において、63は高倍観察用対物レンズ61および低倍観察用対物レンズ62を選択的に観察光路上に配置するための観察倍率切換手段であり、例えば電動モータ等の手段を利用する。

【0073】

一方、64はコンバージョンレンズユニット19をレーザ導入光路上に挿脱す

るための照明範囲切換手段であり、例えば電動モータ等の手段を利用する。また、65は観察倍率切換手段63および照明範囲切換手段64の駆動信号を発信する制御部（以下、PCと称する）であり、66はPC65の駆動信号を受け取って観察倍率切換手段63および照明範囲切換手段64を駆動するドライバである。

【0074】

以上に述べたような本発明の第3実施形態の構成によれば、PC65からの駆動プログラムを、高倍観察用対物レンズ61が観察光路に配置された時にはコンバージョンレンズユニット19がレーザ導入光路に挿入されるようにし、逆に低倍観察用対物レンズ62が観察光路に挿入された時にはコンバージョンレンズユニット19がレーザ導入光路から外れるように構成することにより、観察倍率を切り換えた時に、その視野に略一致したレーザ光照射範囲への切換を連動して行うことができる。

（変形例）以上、本発明の第3実施形態について説明したが、対物レンズが3本以上有る場合には、それに対応した照明範囲縮小率の異なる複数のコンバージョンレンズユニットを設けて、PC駆動による連動切換を行うことができる。

【0075】

また、連動動作が必要とされない場合には、観察倍率切換手段63および照明範囲切換手段64を独立に切り換えることも可能である。

この場合は、観察倍率切換手段63および照明範囲切換手段64の移動方法は手動によっても良い。

（第4実施形態）図6は本発明の第4実施形態の構成を示したものであり、前述と同一の構成要素には同一の符号を付けて説明を省略する。

【0076】

以下、図6において、191はファイバ出射端16と集光レンズ17の間にレーザ導入光路の光軸方向に移動可能に配置され、ファイバ出射端16からの発散レーザ光のNAを変換する凸レンズである。192は凸レンズ191と集光レンズ17の間にレーザ導入光路の光軸方向に移動可能に配置され、凸レンズ191によってNA変換されたレーザ光を、集光レンズ17を通してコンデンサレンズ

1 の前側焦点位置近傍に集光させるように焦点距離を調整する凹レンズである。
193 および 194 は、それぞれ凸レンズ 191 および凹レンズ 192 をレーザ導入光路の光軸方向に移動するための移動手段であり、例えば電動モータ等の手段を利用する。

【0077】

また、195 は移動手段 193 および 194 の駆動信号を発信する PC であり、196 は PC 195 の駆動信号を受け取って移動手段 193 および 194 を駆動するドライバである。ここで、PC 195 からの駆動プログラムは、凸レンズ 191 の位置移動に応じてレーザ光の集光位置をコンデンサレンズ 1 の前側焦点位置近傍に合わせ込む様に凹レンズ 192 の位置を決定し、決定された位置情報に基づいて各々のレンズの移動手段 193 および 194 の移動量を制御するように組まれている。

【0078】

次に、本実施形態の構成の作用について述べる。

移動手段 193 および 194 は、PC 195 の駆動信号に基づいてドライバ 196 により駆動され、凸レンズ 191 および凹レンズ 192 をレーザ導入光路の光軸方向に図 6 (a) から図 6 (b) のように移動させる。ここで、PC 195 の駆動プログラムは、凸レンズ 191 の位置移動に応じてレーザ光の集光位置をコンデンサレンズ 1 の前側焦点位置近傍に合わせ込む様に凹レンズ 192 の位置を決定し、決定された位置情報に基づいて移動量が制御されている。

【0079】

従って、凸レンズ 191 の移動によって NA を変換されたファイバ出射端 16 からの発散光（レーザ光）は、それに応じて移動された凹レンズ 192 および集光レンズ 17 を通ることで焦点距離を調整され、コンデンサレンズ 1 の前側焦点位置近傍に集光される。

【0080】

従って、集光位置を変えることなく入射 NA のみが連続的に変換され、その結果、コンデンサレンズ 1 を通った後の斜め方向に進む平行光線の光線束径、すなわち標本 4 におけるレーザ光照射範囲は連続的に変換され、それに対応してレー

ザ光のエネルギー密度も連続的に変換される。

【0081】

以上に述べたような本発明の第4実施形態の構成によれば、標本4におけるレーザ光照射範囲ひいてはエネルギー密度を連続的に変換することができる。このことにより、強いパワーで微弱蛍光を検出したい場合にはレーザ光照射範囲を凝縮し、広い範囲を蛍光観察したい場合にはレーザ光照射範囲を拡大する、といった様な、用途に応じた使い分けが可能となる。

(変形例) 以上、本発明の第4実施形態について説明したが、本実施形態を用いて以下に説明するような変形例も可能である。

【0082】

図7は本実施形態の変形例の構成を示したものであり、図6と同一の構成要素には同一の符号を付けて説明を省略する。

以下、図7において、610は観察倍率の異なる複数の対物レンズ（図7においては611～616）を保持し、選択的に観察光路に配置する対物レンズレボルバであり、617はレボルバ610を回転して対物レンズを切り換える観察倍率切換手段であり、例えば電動モータ等の手段を利用する。

【0083】

観察倍率切換手段617の駆動は、PC195の駆動信号に基づいてドライバ196により行われる。ここで、PC195の駆動プログラムは、対物レンズの観察倍率を選択して切換手段617を駆動すると共に、その観察倍率での観察範囲と略一致するレーザ光照射範囲を得るように凸レンズ191および凹レンズ192の位置を決定し、決定された位置情報に基づいて移動手段193および194を駆動するように組まれている。

【0084】

以上に述べたような構成によれば、任意の観察倍率に対して、その観察範囲と略一致したレーザ光照射範囲を自由に設定し、連動して切換を行うことができる。

【0085】

また、上記実施形態では、図6に示すズームレンズユニットは、ファイバ出射

端 16 からの発散レーザ光の NA を変換する凸レンズ 191 と、凸レンズ 191 と集光レンズ 17 の間にレーザ導入光路の光軸方向に移動可能に配置され、凸レンズ 191 によって NA 変換されたレーザ光を、集光レンズ 17 を通してコンデンサレンズ 1 の前側焦点位置近傍に集光させるように焦点距離を調整する凹レンズ 192、即ち、凸レンズと凹レンズとの組み合わせから構成されているとしたが、同一の作用を得られる凸レンズと凸レンズの組み合わせであってもよい。

(第 5 実施形態) 図 8 は本発明の第 5 実施形態の構成を示したものであり、図 1 と同一の構成要素には同一の符号を付けて説明を省略する。

【0086】

以下、図 8 において、L2 は透過照明光路 T を挟んでレーザ導入部 L1 と反対側に配置された、レーザ導入部 L1 と同一の構成を有するレーザ導入部である。レーザ導入部 L2 は、レーザ導入部 L1 と同様にベース 18 上において顕微鏡に固定される。

【0087】

なお、レーザ導入部 L2 から透過照明光路 T に導入されるレーザ光の波長は、単波長の λ_{L2} であるとする。

図 9 は本実施形態におけるレーザ導入部の配置を説明するために、図 8 の構成を下から見たものである。

【0088】

図 9 において、L3、L4 は図 8 には図示されていないレーザ導入部であり、既に説明したレーザ導入部 L1、L2 と同様にベース 18 上において顕微鏡に固定される。

【0089】

ここで、各々のレーザ導入部は、透過照明光路 T を中心に、且つ前記透過照明用光路の光軸に対して略直交する方向に放射状に複数配置する。

なお、レーザ導入部 L3 及び L4 から透過照明光路 T に導入されるレーザ光の波長は、各々単波長の λ_{L3} 及び λ_{L4} であるとする。

【0090】

次に、本実施形態における観察側の構成について述べる。

図 8 において、21 は対物レンズ 6 から出射した観察光路上に配置された第 1 のダイクロイックミラーであり、波長 λ_1 を基準に短波長側を反射し、長波長側を透過する特性を持つ。第 1 のダイクロイックミラー 21 の反射光路上には第 1 の結像レンズ 22 が配置され、その延長上には第 2 のダイクロイックミラー 23 が配置される。第 2 のダイクロイックミラー 23 は、前述の波長 λ_1 よりも短い波長 λ_2 を基準に短波長側を反射し、長波長側を透過する特性を持つ。

【0091】

第 2 のダイクロイックミラー 23 の反射光路上には第 1 の吸収フィルタ 24 が配置され、その延長上の第 1 の結像レンズ 22 の焦点位置には第 1 の撮像素子 25 が配置される。

【0092】

第 1 の吸収フィルタ 24 は、波長 λ_2 より短い特定の波長帯 λ_{E1} のみを透過するバンドパスフィルタである。第 2 のダイクロイックミラー 23 の透過光路上には第 2 の吸収フィルタ 26 が配置され、その延長上の第 1 の結像レンズ 22 の焦点位置には第 2 の撮像素子 27 が配置される。第 2 の吸収フィルタ 26 は、波長 λ_2 から λ_1 までの間の特定の波長帯 λ_{E2} のみを透過するバンドパスフィルタである。

【0093】

一方、第 1 のダイクロイックミラー 21 の透過光路上には第 2 の結像レンズ 28 が配置され、その延長上には全反射プリズム 29 が配置され、全反射プリズム 29 の反射光路上には第 3 のダイクロイックミラー 30 が配置される。

【0094】

第 3 のダイクロイックミラー 30 は、前述の波長 λ_1 よりも長い波長 λ_3 を基準に短波長側を反射し、長波長側を透過する特性を持つ。第 3 のダイクロイックミラー 30 の反射光路上には第 3 の吸収フィルタ 31 が配置され、その延長上の第 2 の結像レンズ 28 の焦点位置には第 3 の撮像素子 32 が配置される。

【0095】

第 3 の吸収フィルタ 31 は、波長 λ_1 から λ_3 までの間の特定の波長帯 λ_{E3} のみを透過するバンドパスフィルタである。第 3 のダイクロイックミラ

ー 30 の透過光路上には第 4 の吸収フィルタ 33 が配置され、その延長上の第 2 の結像レンズ 28 の焦点位置には第 4 の撮像素子 34 が配置される。

【0096】

第 4 の吸収フィルタ 33 は、波長 λ 3 より長い特定の波長帯 λ E4 のみを透過するバンドパスフィルタである。

図 10 は、以上に説明した各ダイクロイックミラー及び吸収フィルタによって分離される波長の関係を示したものである。

【0097】

次に、本実施形態の構成の作用について述べる。

レーザ発振器 14 から発振された波長 λ L1 のレーザ光は、ファイバ 15 に導入され、ファイバ出射端 16 から発散光線として出射され、集光レンズ 17 を通って収束光線に変換され、反射ミラー 9 によって透過照明光路 T の最も外側近傍の位置でコンデンサレンズ 1 側に反射され、コンデンサレンズ 1 の前側焦点位置近傍で一旦集光された後、コンデンサレンズ 1 を通って、斜め方向に進む平行光線としてコンデンサレンズ 1 から出射され、イマージョンオイル 2 を介してスライドガラス 3 と標本 4 との境界面に入射する。

【0098】

ここで、スライドガラス 3 と標本 4 との境界面へのレーザ光の入射角 θ L1 が全反射の臨界角より大きければ、レーザ光は境界面で全反射し、標本 4 側にエバネッセント光が浸み出す。

【0099】

標本 4 中に存在する特定の蛍光物質は、波長 λ L1 のエバネッセント光により励起され、蛍光の最大輝度波長が第 1 の吸収フィルタ 24 の透過波長帯 λ

E1 の中に有るような蛍光を発する。蛍光はカバーガラス 5 を通って対物レンズ 6 に入り、観察光路中のダイクロイックミラー及び吸収フィルタによって透過及び反射を選択され、最終的に第 1 の撮像素子 25 で波長帯 λ E1 の蛍光像が撮像される。

【0100】

一方で、前述したように、マイクロメータ操作部 13 を回転することで透過照

明光路 T に略直交する方向に反射ミラー 9 は直動する。反射ミラー 9 の位置が移動すると、前述のレーザ光が反射した後のコンデンサレンズ 1 への入射位置が移動し、コンデンサレンズ 1 からの出射角度、ひいてはスライドガラス 3 と標本 4 との境界面への入射角 θ L 1 が変わる。

【0101】

既に述べたように、全反射照明におけるエバネッセント光の浸み出し深さは境界面への光の入射角によって変わるので、マイクロメータ操作部 13 を回転して反射ミラー 9 を移動させることで、エバネッセント光の浸み出し深さ d L 1 を任意に変化させることができる。

【0102】

透過照明光源 7 からの光を用いた透過照明観察を行う時には、反射ミラー 9 は透過照明光路 T から完全に退避させることができる。

レーザ導入部 L 2 についても同様で、波長 λ L 2 のレーザ光を導入し、スライドガラス 3 と標本 4 との境界面への入射角 θ L 2 を変えることで、エバネッセント光の浸み出し深さ d L 2 を任意に変化させることができる。

【0103】

標本 4 中に存在する特定の蛍光物質は、波長 λ L 2 のエバネッセント光により励起され、蛍光の最大輝度波長が第 2 の吸収フィルタ 26 の透過波長帯 λ

E 2 の中に有るような蛍光を発する。蛍光はカバーガラス 5 を通って対物レンズ 6 に入り、観察光路中のダイクロイックミラー及び吸収フィルタによって透過及び反射を選択され、最終的に第 2 の撮像素子 27 で波長帯 λ E 2 の蛍光像が撮像される。

【0104】

レーザ導入部 L 3、L 4 についても同様であり、波長 λ L 3、 λ L 4 のエバネッセント光により励起された蛍光は、各々観察光路中のダイクロイックミラー及び吸収フィルタによって透過及び反射を選択され、最終的に第 3 の撮像素子 32 で波長帯 λ L 3 の蛍光像が、第 4 の撮像素子 34 で波長帯 λ L 4 の蛍光像が、それぞれ撮像される。

【0105】

以上に述べたような本発明の第5実施形態の構成及び作用によれば、各々のレーザ導入部は、標本4から見てコンデンサレンズ1より遠くの位置で構成されており、標本4の近くのスペースを圧迫しない。また、構造が単純で動作範囲も狭いため、装置自体をコンパクトにでき、放射状に複数個を配置することが可能である。また、各レーザ導入部L1～L4は、それぞれレーザ波長及びエバネッセント光の浸み出し深さを個別に設定することが可能である。

【0106】

従って、観察対象となる標本において、たとえばCFP、GFP、YFP、RFP等、複数の種類の蛍光物質を使って別々の部位を標識した場合、各々の部位の位置する深さに対応して、各々を励起する波長のエバネッセント光の浸み出し深さを最適に調整することが可能である。また、各々のレーザ導入部は、他のレーザ導入部に対して完全に独立した構成であるため、使用する者の用途に応じて光学特性を独立に設定したり、必要個数の設置や増設、取り外しも可能である。また、照明側（コンデンサレンズ側）と観察側（対物レンズ側）が分離しているため、マルチバンドのダイクロイックミラーが必要なく、取り扱いが容易である。

【0107】

以上に述べたように、コンパクトで取り扱いが容易であり、複数個による構成や増設が容易であると共に、複数の波長のレーザ光を用いて、各々独立してエバネッセント光の浸み出し深さを設定し、同時に照射することが可能な、優れたシステム性を有する全反射蛍光顕微鏡とすることができる。

（変形例）以上、本発明の第5実施形態について説明したが、レーザ導入部の個数は、スペースの余裕があれば更に追加することもできる。

【0108】

スライドガラス3の代わりに、ガラスボトムディッシュを用いて、カバーガラス5を除外しても良い。この場合には、対物レンズ6は作動距離が短い場合には液浸対物レンズを用いる。

【0109】

また、反射ミラー9の移動手段はマイクロメータに限らず、例えば電動モータ

やピエゾアクチュエータ等を用いても良い。

また、反射ミラー 9 を固定し、ファイバ出射端 16 および集光レンズ 17 を透過照明光路 T の光軸と平行な方向に一体的に移動させる構成によっても、本実施形態と同様の作用を得られる。この場合においても、移動手段はマイクロメータ、電動モータおよびピエゾアクチュエータ等を用いて構成することができる。

【0110】

また、上述した実施形態は正立型顕微鏡に適用していたが、これに限られるものではなく、構成を上下反転して、倒立顕微鏡において構成することも可能である。

【0111】

また、観察光路上の構成は、各々の励起波長に対する蛍光波長を選別して撮像できる手段であれば、本実施形態に述べたような構成に限定されず、自由に構成することが可能である。

【0112】

また、図 11 に示したように、レーザ導入部の各々において、レーザ光の導入および遮断を選択するシャッタを設置すると共に、各々のシャッタの開閉をシャッタコントローラにより制御するようにすれば、標本に導入されるレーザ光を取捨選択することが可能となる。

【0113】

更に、複数のレーザ導入部のうち、少なくとも 2 つのレーザ導入部から導入されるレーザ光の波長を同一に設定すれば、各々の浸み出し深さを変えてシャッタの開閉により交互に照明することにより、同じ蛍光物質による蛍光の、浸み出し深さの違いによる観察像を比較することで、その蛍光の発生源の深さを特定することが可能となる。

【0114】

また、上述した実施形態では、各レーザ導入部に各々単一の波長のレーザ光を発振するレーザ発振器が設けられている例で説明したが、これに限られるものではなく、例えば、多波長のレーザ光を発振するレーザ発振器であってもよく、また、図 12 に示すようなレーザコンバイナと呼ばれるものを用いても良い。

【0115】

図12に示すレーザコンバイナとは、異なる波長のレーザ光を発振するレーザ発振器70a～70cの各々から発振されたレーザ光を一つにまとめてファイバ75に集光するもので、レーザ発振器70cから出射されたレーザ光は、ミラー71によって反射され、レーザ発振器70a、70bから出射された各々のレーザ光は、ダイクロイックミラー73、72により、レーザ発振器70cから出射されたレーザ光と合成され、集光レンズ74によってファイバ75に集光されることで、多波長のレーザ発振をするものである。

【0116】

このような多波長のレーザ光を用いることで、一つのレーザ導入部で異なる励起波長域を持つ複数の蛍光物質を励起させることができる。

(第6実施形態) 図13は本発明の第6実施形態の構成を示したものであり、図8、9と同一の構成要素には同一の符号を付けて説明を省略する。

【0117】

以下、図13において、C1は第2のダイクロイックミラー23と第2の撮像素子27の間の光路上に設けられた光路長調整部である。ここで、光路長調整部C1は、固定プリズム群41と、固定プリズム群41に隣接して設けられた移動プリズム42と、移動プリズム42を直動させる移動手段43により構成される。

【0118】

移動プリズム42は、第1の結像レンズ22の結像位置に第2の撮像素子27が有る状態の光路長を基準位置として、光路長が変化する方向に移動されるように構成されている。また、移動手段43は、移動プリズム42を直動させる手段であれば何でも良く、例えば電動モータやピエゾアクチュエータ等を利用する。また、44は各々の撮像素子により撮像された画像を処理すると共に、移動手段43の駆動信号を発信するPCである。45はPC44の駆動信号を受け取って移動手段43を駆動するドライバである。

【0119】

また、図14は本実施形態における標本4の内部及び観察光路を拡大したもの

である。図 14 において、F 1 はレーザ導入部 L 1 から導入されるレーザ光の波長 λ L 1 により励起され、蛍光の最大輝度波長が第 1 の吸収フィルタ 24 の透過波長帯 λ E 1 の中に有る第 1 の蛍光物質である。F 2 はレーザ導入部 L 2 から導入されるレーザ光の波長 λ L 2 により励起され、蛍光の最大輝度波長が第 2 の吸収フィルタ 26 の透過波長帯 λ E 2 の中に有る第 2 の蛍光物質である。

【0120】

各々の蛍光物質は、標本 4 内の細胞において、それぞれ特定の小器官で特異的に発現するように導入されている。ここでは、第 1 の蛍光物質 F 1 は細胞膜に近接する小器官に発現し、第 2 の蛍光物質 F 2 は細胞膜から若干離れた位置にある小器官に発現するものとする。

【0121】

そこで、蛍光物質 F 1 を励起するためのエバネッセント光の浸み出し深さ d L 1 は浅めに設定され、一方蛍光物質 F 2 を励起するためのエバネッセント光の浸み出し深さ d L 2 は d L 1 よりも深めに設定される。また、対物レンズ 6 の焦点は、第 1 の蛍光物質 F 1 が発現する小器官に合わせてある。

【0122】

従って、第 2 の蛍光物質 F 2 が発現する小器官の位置は、対物レンズ 6 の焦点位置より対物レンズ 6 側に近付いた位置にある。

次に、本実施形態の構成の作用について述べる。

【0123】

レーザ導入部 L 1 のマイクロメータ回転部 13 を回転することで、波長 λ L 1 のエバネッセント光が第 1 の蛍光物質 F 1 に届く深さになるように調整される。同様に、レーザ導入部 L 2 からの波長 λ L 2 のエバネッセント光も第 2 の蛍光物質 F 2 に届く深さになるように調整される。

【0124】

対物レンズ 6 の焦点位置にある第 1 の蛍光物質 F 1 から発した蛍光は、対物レンズ 6 を通って平行光線となり、第 1 のダイクロイックミラー 21 を反射し、第 1 の結像レンズ 22 を通って収束光線となり、第 2 のダイクロイックミラー 2

3、第1の吸収フィルタ24を経て、第1の撮像素子25の撮像面上で結像される。

【0125】

一方、対物レンズ6の焦点位置より対物レンズ6側にずれた位置にある第2の蛍光物質F2から発した蛍光は、図14の点線で示すように、対物レンズ6を通して僅かに発散する光線となり、第1のダイクロイックミラー21を反射し、第1の結像レンズ22を通して収束光線となるが、移動プリズム42が基準位置にある状態では、第2のダイクロイックミラー23、光路長調整部C1、第2の吸収フィルタ26を経た後の結像位置は、第2の撮像素子27の撮像面を通り過ぎた後の位置になるため、第2の撮像素子27で撮像された第2の蛍光物質F2の蛍光像は焦点が合っていないピンぼけ像になる。

【0126】

ここで、PC44から駆動信号を発信し、ドライバ45を作動させて移動手段43駆動することにより、移動プリズム42を固定プリズム群41から離れる方向に直動させると、第2の撮像素子27に至る光路長が伸長され、前に述べた第2の蛍光物質F2から発した蛍光の結像位置が第2の撮像素子27の撮像面に近づく。

【0127】

図15は、上記の作用により、第2の蛍光物質F2から発した蛍光の結像位置が第2の撮像素子27の撮像面と合致した状態を示したものである。この状態において、対物レンズ6の焦点位置より対物レンズ6側にずれた位置にある第2の蛍光物質F2から発した蛍光は、第2の撮像素子27の撮像面上で結像されている。

【0128】

またこの時、PC44は、移動プリズム42の基準状態からの移動量を基にして、対物レンズ6の焦点位置に対する第2の蛍光物質F2の位置ずれ量を計算すると共に、第2の撮像素子27の撮像面上での拡大倍率のずれ量を計算して、撮像された画像を倍率補正する画像処理を行う。

【0129】

以上に述べたような本発明の第 6 実施形態の構成及び作用によれば、対物レンズ 6 を固定したままで、標本 4 上の異なる深さ位置にある、第 1 の蛍光物質 F 1 が発現する小器官と第 2 の蛍光物質 F 2 が発現する小器官のように、異なる深さの面を、全反射照明による高いコントラストで同時観察することが可能となる。

(変形例) 以上、本発明の第 6 実施形態について説明したが、光路長調整部 C 1 と同様な構成による光路長調整部を、第 2 の撮像素子 2 7 以外の撮像素子に至る光路上にも配置できることは言うまでもない。

【 0 1 3 0 】

この場合は、ドライバ 4 5 はこれら複数の光路長調整部を駆動するための複数のチャンネルを有し、各々は P C 4 4 からの駆動信号により独立に制御される。

また、光路長調整部 C 1 を設ける代わりに、第 2 の撮像素子 2 7 自体を光路と平行な方向に直動させることでも同様な効果を得られる。

【 0 1 3 1 】

他の撮像素子についても、同様にそれ自体を駆動させることで同様な効果を得ることができる。

また、本実施形態においても第 5 実施形態と同様に、図 1 1 に示したように、レーザ導入部の各々において、レーザ光の導入および遮断を選択するシャッタを設置すると共に、各々のシャッタの開閉をシャッタコントローラにより制御するようにすれば、標本に導入されるレーザ光を取捨選択することが可能となる。

【 0 1 3 2 】

更に、複数のレーザ導入部のうち、少なくとも 2 つのレーザ導入部から導入されるレーザ光の波長を同一に設定すれば、各々の浸み出し深さを変えてシャッタの開閉により交互に照明することにより、同じ蛍光物質による蛍光の、浸み出し深さの違いによる観察像を比較することで、その蛍光の発生源の深さを特定することが可能となる。

【 0 1 3 3 】

【発明の効果】

本発明は、60 倍よりも低い観察倍率の対物レンズにおける全反射蛍光観察を

可能にすると共に、コンパクトで標本の操作スペースを圧迫しない優れた作業性を有する全反射蛍光顕微鏡を提供することができる。

【0 1 3 4】

また、異なる倍率の対物レンズの観察範囲に合わせてレーザ光照射範囲を変換できる全反射蛍光顕微鏡を提供することができる。

また、レーザ光の導入部を複数構成することで、異なる波長、異なる浸み出し深さのエバネッセント光を同時に照射できる全反射蛍光顕微鏡を提供することができる。

【0 1 3 5】

また、照明に異なる深さのエバネッセント光を組み合わせて、異なる深さの面を高いコントラストで同時に蛍光観察ができる全反射蛍光顕微鏡を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の第 1 実施形態の構成を示した図である。

【図 2】

本発明の第 2 実施形態の構成を示した図である。

【図 3】

(a) (b) 本発明の第 2 実施形態のコンバージョンレンズユニットを示した図である。

【図 4】

本発明の第 3 実施形態の構成を示した図である。

【図 5】

本発明の第 3 実施形態の一部構成を示した図である。

【図 6】

(a) (b) 本発明の第 4 実施形態の一部構成を示した図である。

【図 7】

本発明の第 4 実施形態の変形例の構成を示した図である。

【図 8】

本発明の第 5 実施形態の構成を示した図である。

【図 9】

本発明の第 5 実施形態の一部構成を示した図である。

【図 1 0】

本発明の第 5 実施形態における各ダイクロイックミラー及び吸収フィルタによって分離される波長の関係を示した図である。

【図 1 1】

本発明の第 5 実施形態の変形例の一部構成を示した図である。

【図 1 2】

本発明の第 5 実施形態の変形例の一部構成を示した図である。

【図 1 3】

本発明の第 6 実施形態の構成を示した図である。

【図 1 4】

本発明の第 6 実施形態の一部構成を示した図である。

【図 1 5】

本発明の第 6 実施形態の一部構成を示した図である。

【図 1 6】

(a) (b) (c) 従来技術の構成を示した図である。

【図 1 7】

従来技術の構成を示した図である。

【図 1 8】

従来技術の構成を示した図である。

【符号の説明】

- 1 コンデンサレンズ
- 2 イメージングオイル
- 3 スライドガラス
- 4 標本
- 5 カバーガラス
- 6 対物レンズ

- 7 透過照明光源
- 8 コレクタレンズ
- 9 反射ミラー
- 10 ミラー保持部
- 11 マイクロメータヘッド
- 12 バネ
- 13 マイクロメータ操作部
- 14 レーザ発振器
- 15 ファイバ
- 16 ファイバ出射端
- 17 集光レンズ
- 18 ベース
- 19 コンバージョングルズユニット
- 19 a 凸レンズ
- 19 b 凹レンズ
- 20 ノブ
- 21 第1のダイクロイックミラー
- 22 結像レンズ
- 23 第2のダイクロイックミラー
- 24 (第1の) 吸収フィルタ
- 25 (第1の) 撮像素子
- 26 第2の吸収フィルタ
- 27 第2の撮像素子
- 28 結像レンズ
- 29 全反射プリズム
- 30 第3のダイクロイックミラー
- 31 第3の吸収フィルタ
- 32 第3の撮像素子
- 33 第4の吸収フィルタ

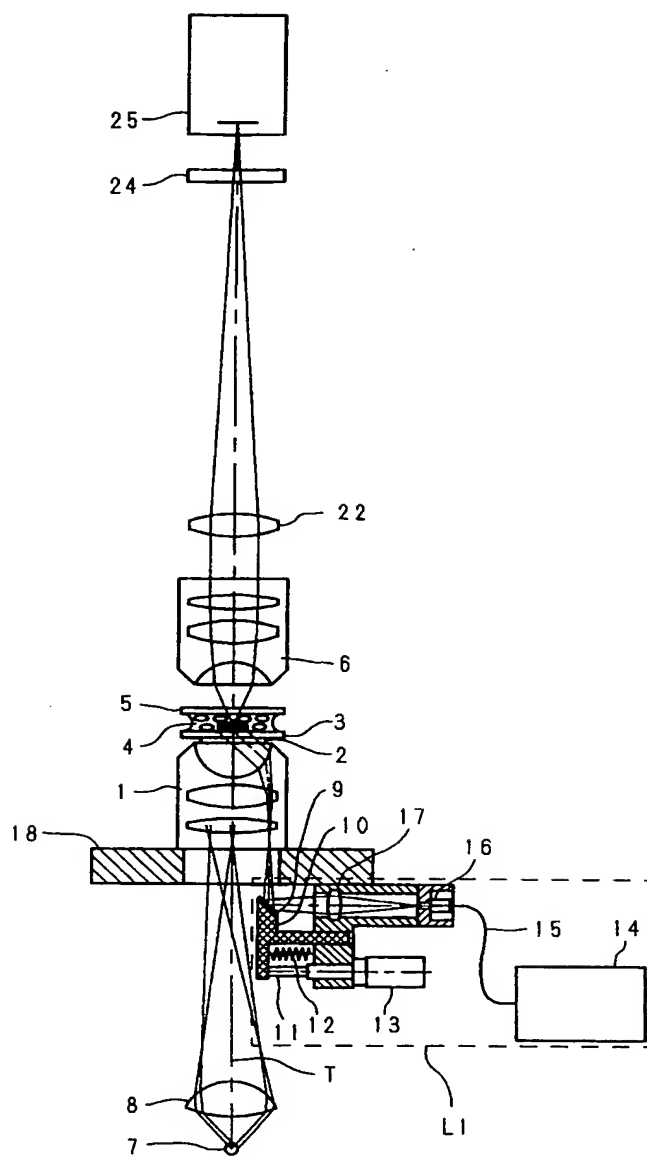
- 3 4 第 4 の撮像素子
 - 4 1 固定プリズム群
 - 4 2 移動プリズム
 - 4 3 移動手段
 - 4 4 P C
 - 4 5 ドライバ
- 6 1 高倍観察用対物レンズ
- 6 2 低倍観察用対物レンズ
- 6 3 観察倍率切換手段
- 6 4 照明範囲切換手段
- 6 5 P C
- 6 6 ドライバ
- 7 0 a ~ 7 0 c レーザ発振器
- 7 1 反射ミラー
- 7 2、7 3 ダイクロイックミラー
- 7 4 集光レンズ
- 7 5 ファイバ
- 1 0 1 標本
- 1 0 2 カバーガラス
- 1 0 3 イマージョンオイル
- 1 0 4 対物レンズ
- 1 0 6 レーザ光
- 1 0 7 ミラー
- 1 0 8 a ミラー
- 1 0 8 b ミラー
- 1 5 0 レーザ照明装置
- 1 6 0 顕微鏡装置
- 1 9 1 凸レンズ
- 1 9 2 凹レンズ

1 9 3 移動手段
1 9 4 移動手段
1 9 5 P C
1 9 6 ドライバ
2 6 1 先玉レンズ
2 6 1 a 側面
6 1 0 ~ 6 1 6 対物レンズ
6 1 7 観察倍率切換手段
L 1 ~ L 4 レーザ導入部
C 1 光路長調整部

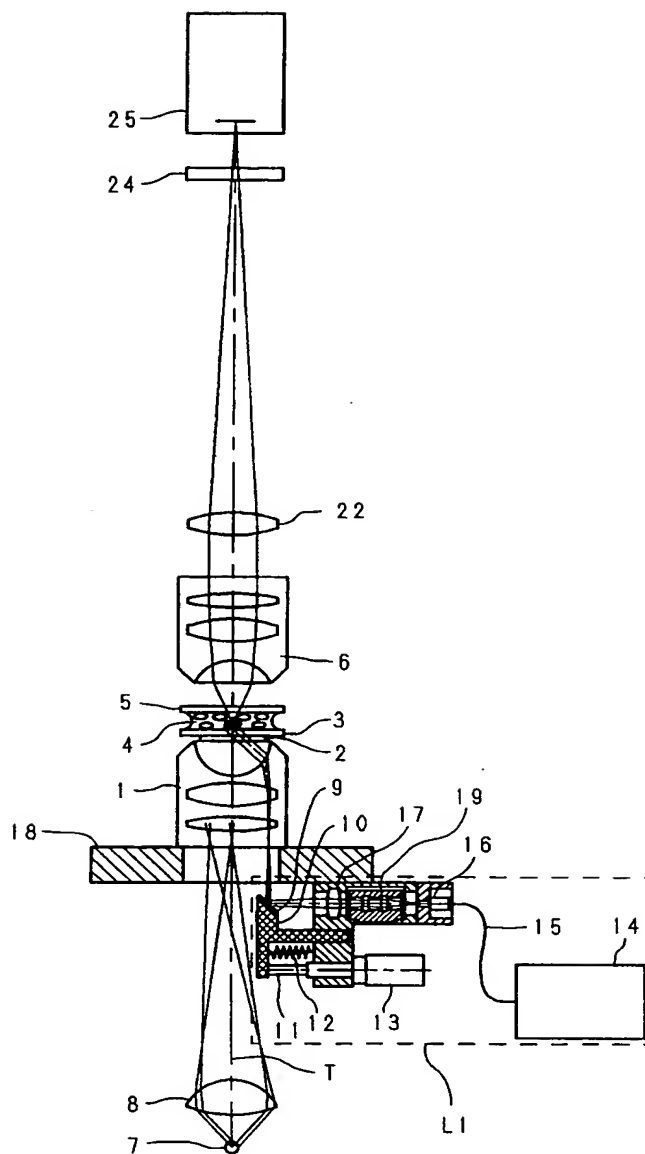
【書類名】

図面

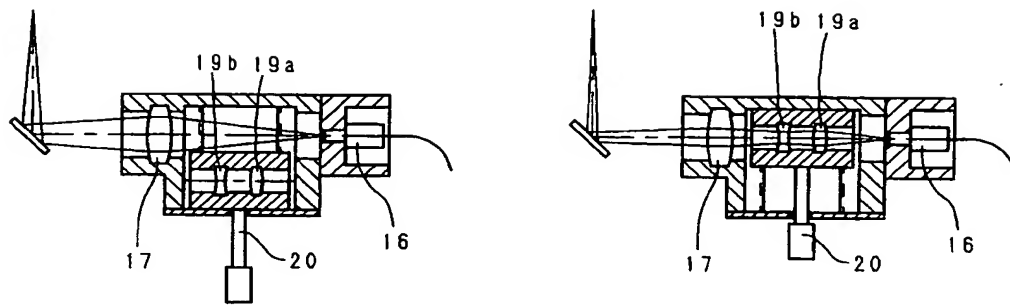
【図 1】



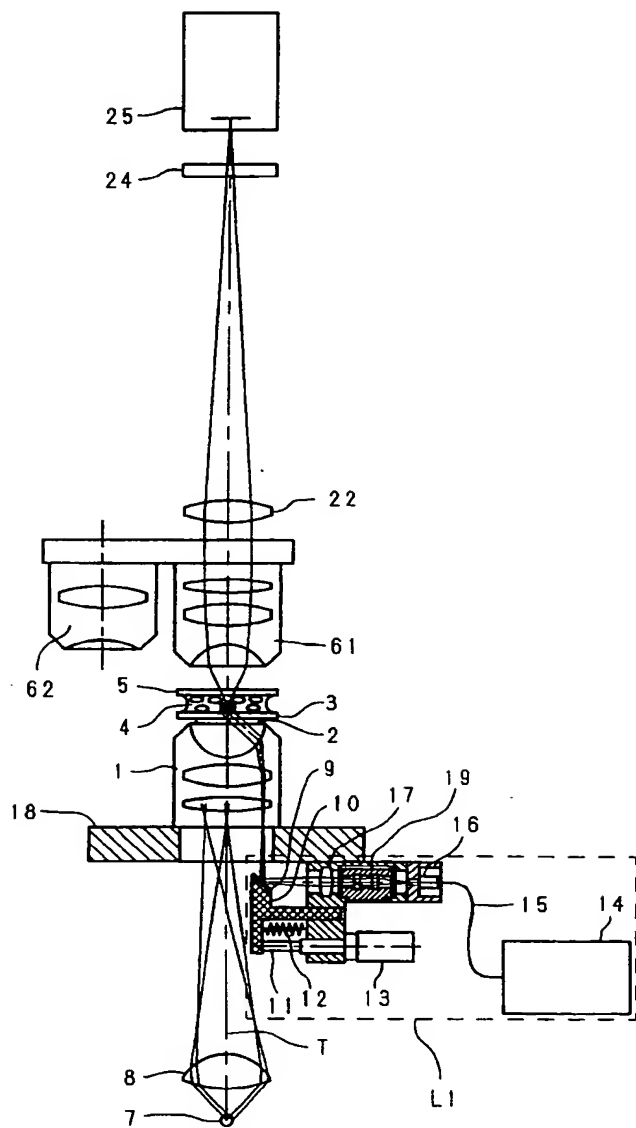
【図 2】



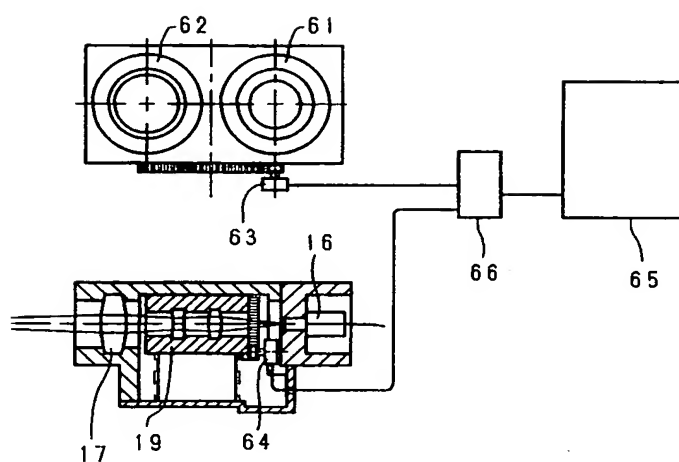
【図 3】



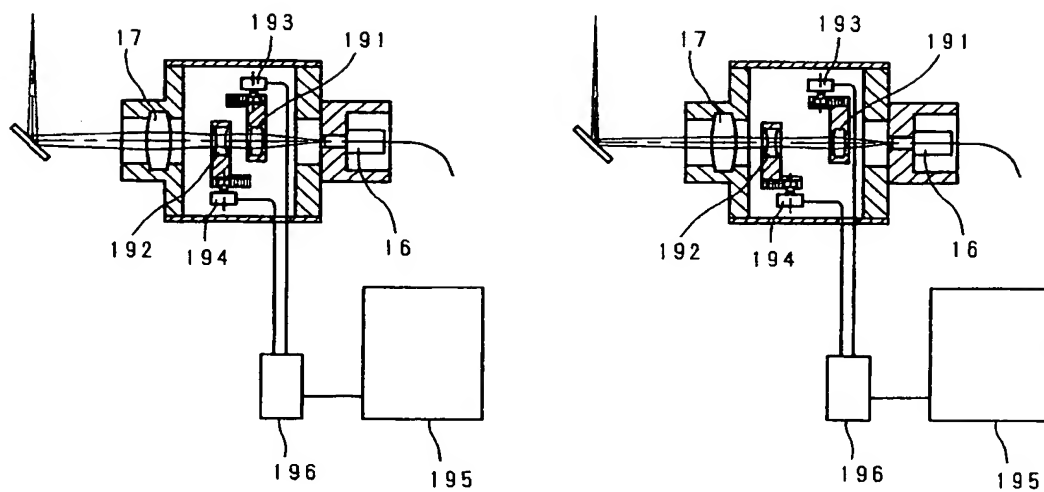
【図 4】



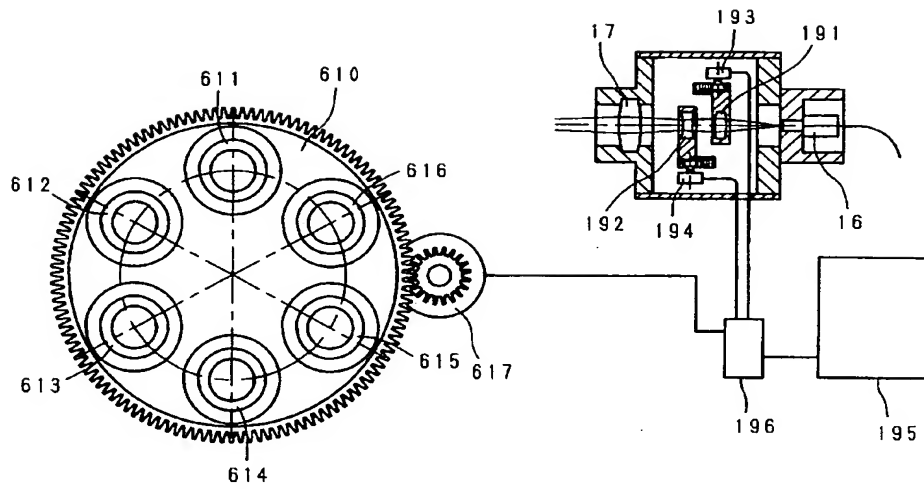
【図 5】



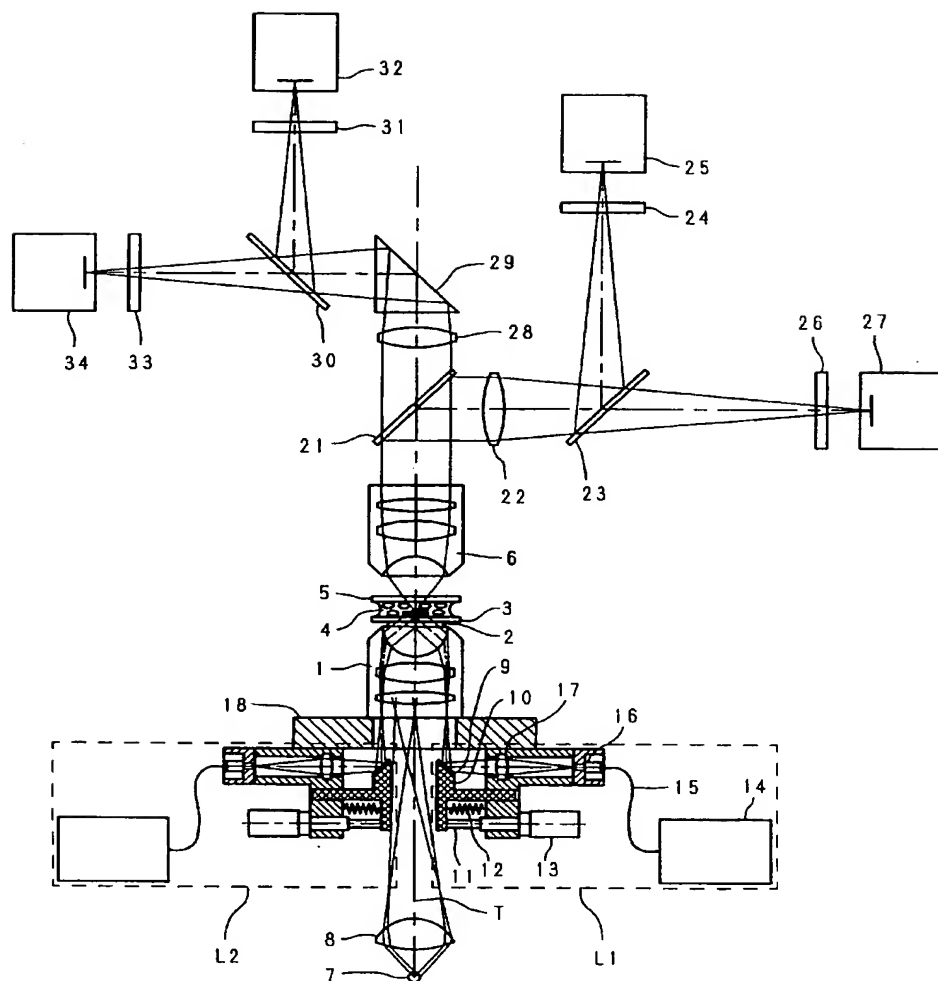
【図 6】



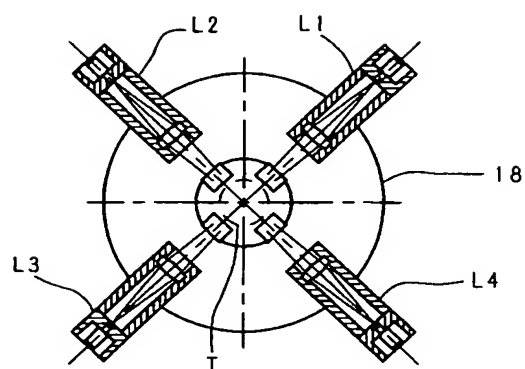
【図 7】



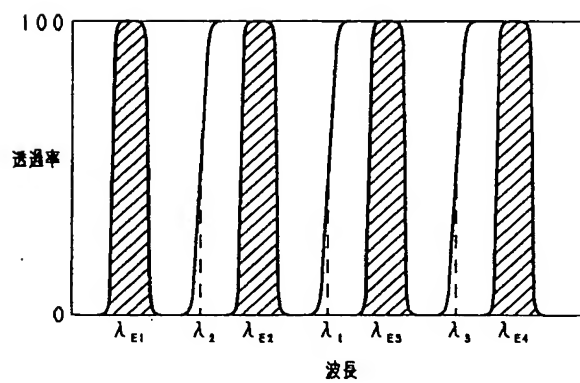
【図 8】



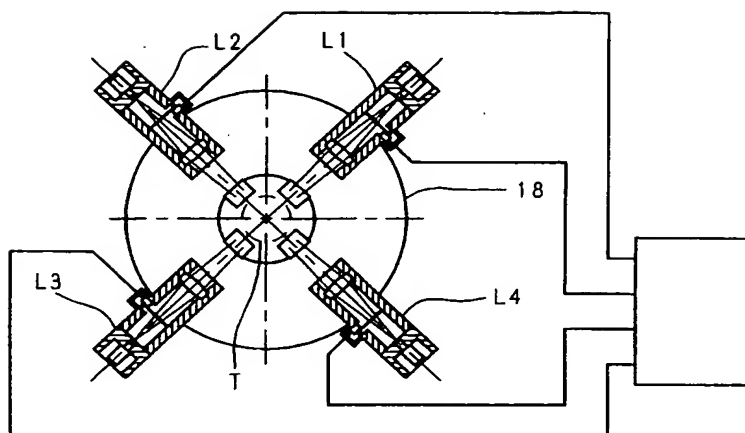
【図 9】



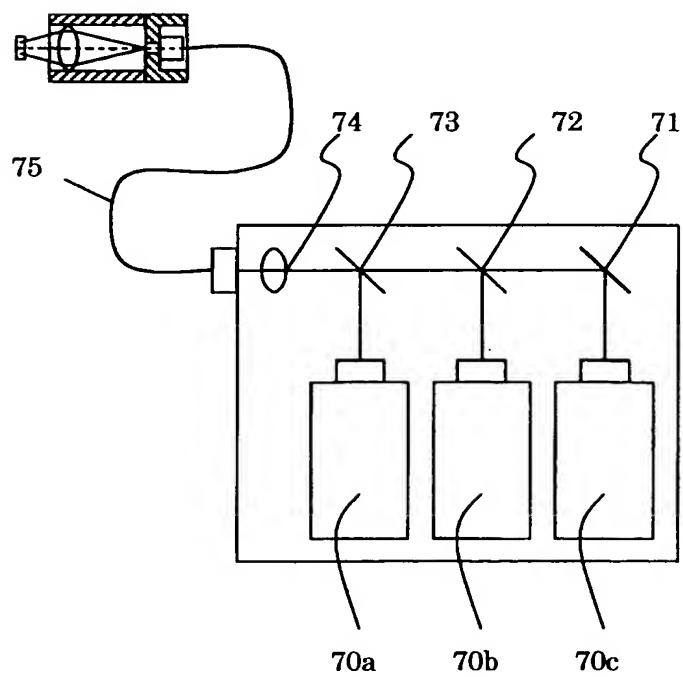
【図 10】



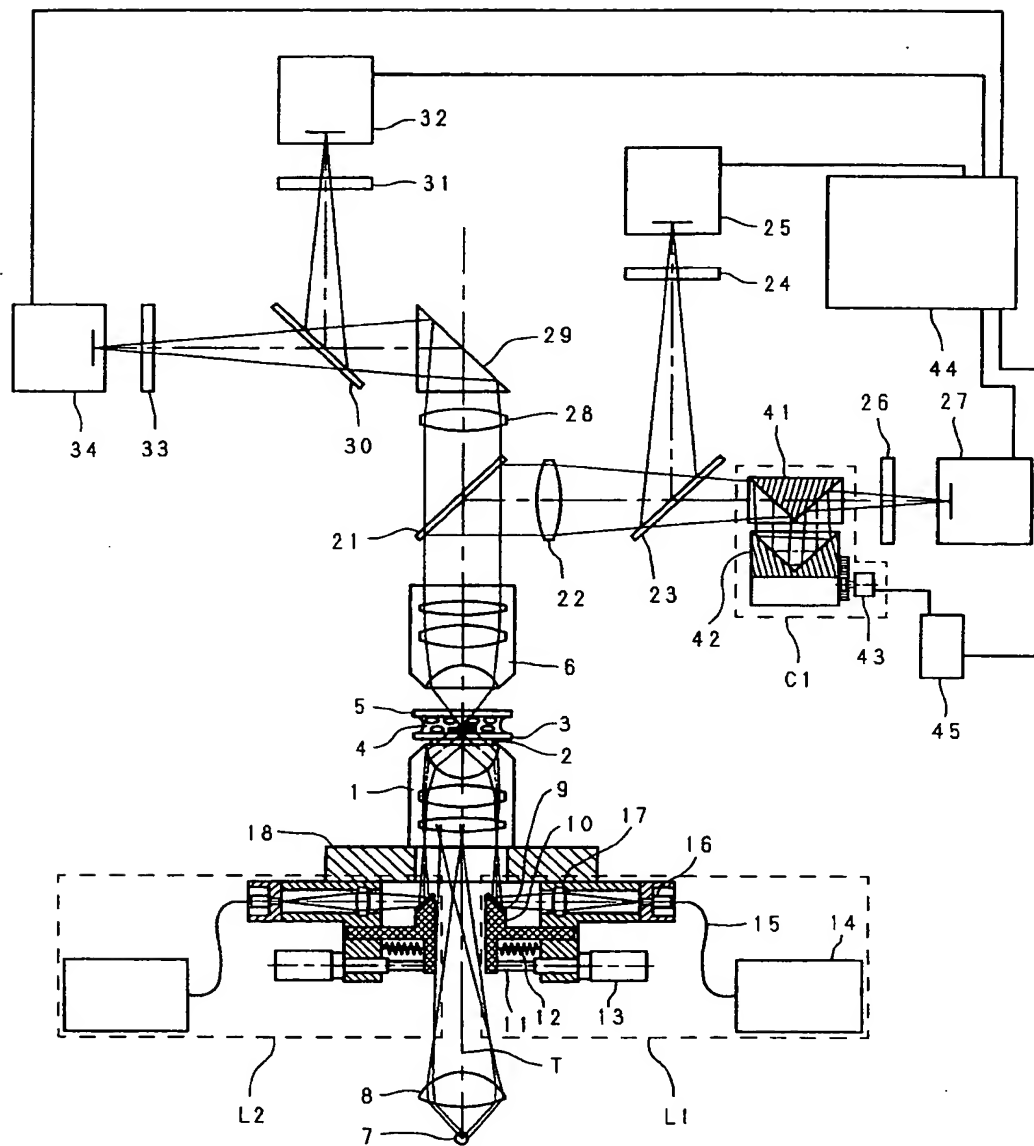
【図 1 1】



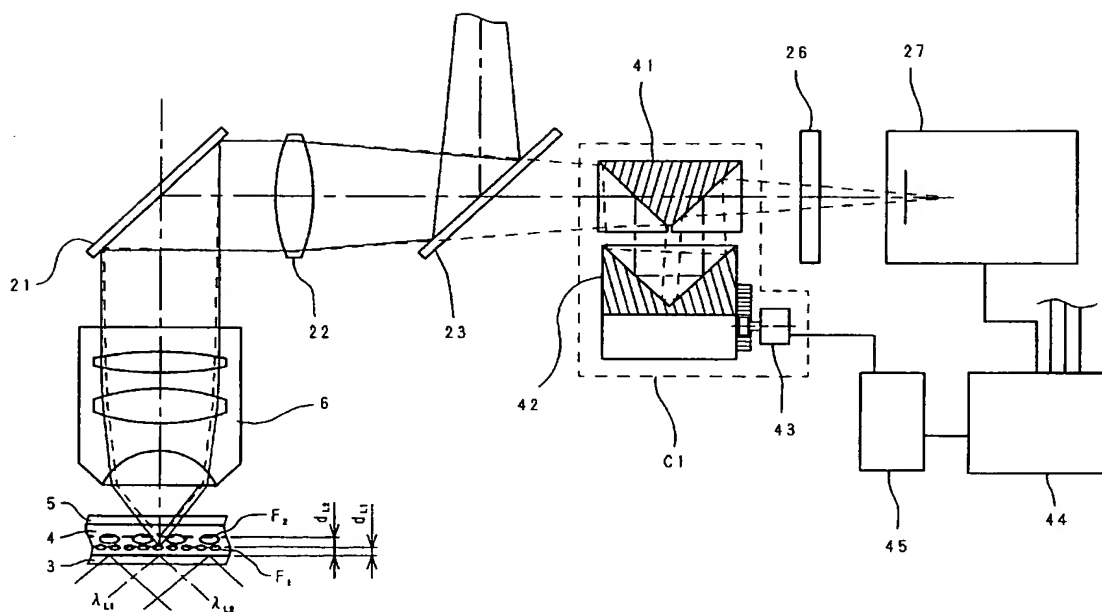
【図 1 2】



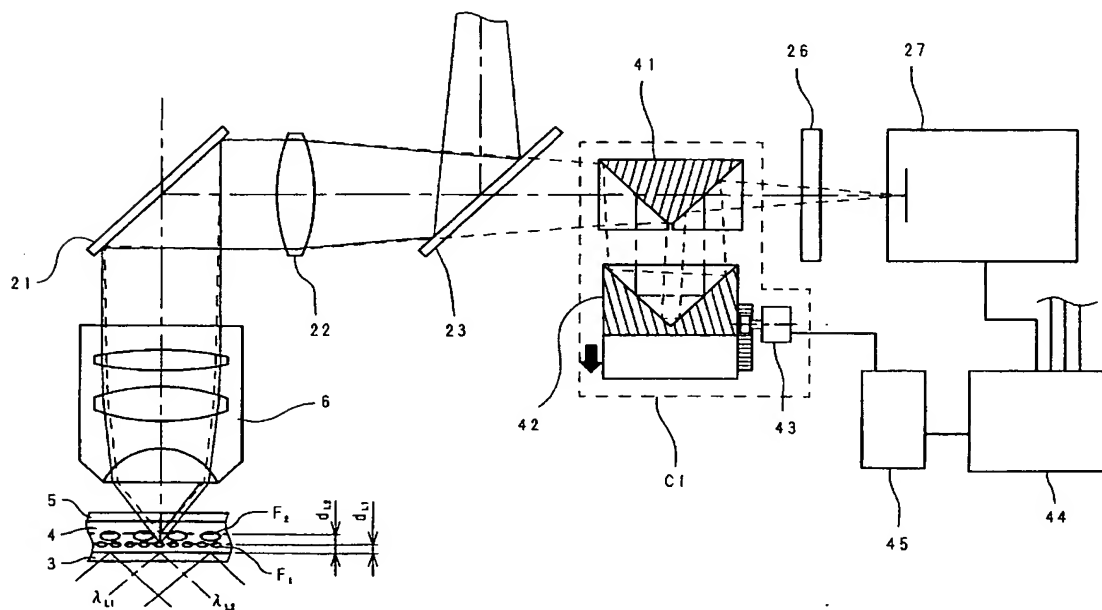
【図 13】



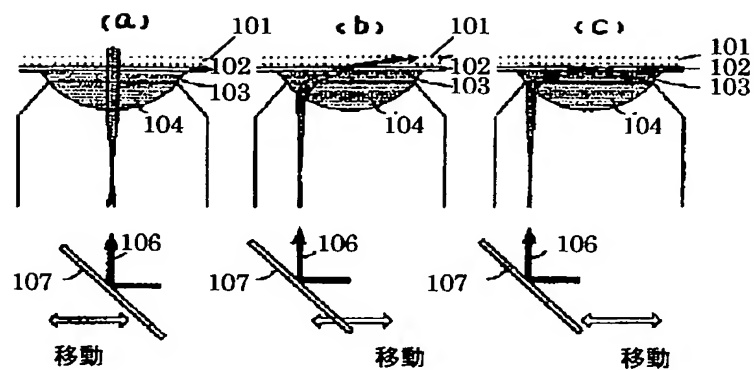
【図 14】



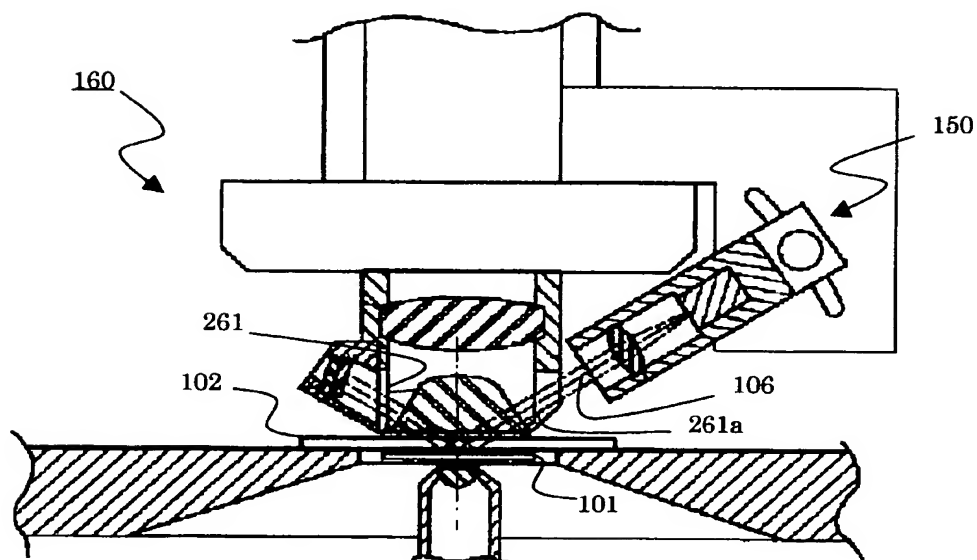
【図 15】



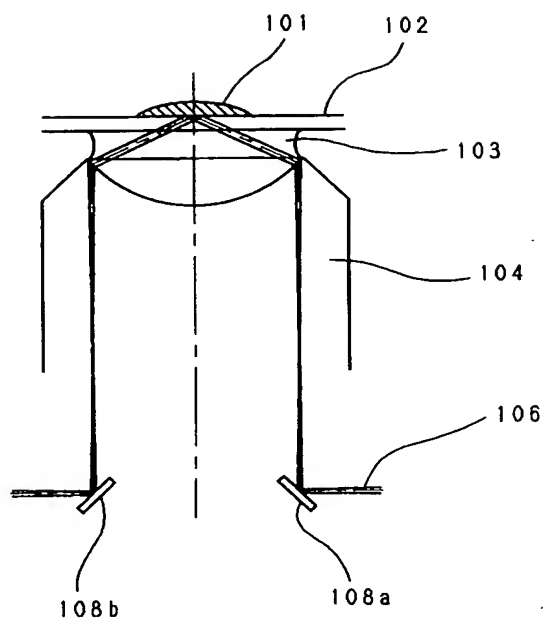
【図 16】



【図 17】



【図 18】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 60倍よりも低い観察倍率の対物レンズにおける全反射蛍光観察を可能にすると共に、コンパクトで標本の操作スペースを圧迫しない優れた作業性を有する全反射蛍光顕微鏡を提供する。

【解決手段】 標本4を挟んで対物レンズ6と対向する位置に配置された、全反射照明が可能な開口数を有する透過照明用のコンデンサレンズ1と、コンデンサレンズ1より光源7側の透過照明光路の最外部近傍で移動可能に保持され、コンデンサレンズ1側にレーザ光を反射導入する反射ミラー9と、反射ミラー9に対して透過照明光路に略直交な方向からレーザ光を入射するレーザ導入光路と、反射ミラー9をレーザ導入光路と平行な方向に移動するミラー保持部とを具備し、レーザ導入光路は、レーザ光をレーザ発振器14から導くためのファイバ15と、ファイバ15の出射端からの発散光線を収束光線に変換し、反射ミラー9を介してコンデンサレンズ1の前側焦点位置近傍に集光させる集光レンズ17と、を具備したものである。

【選択図】 図1



特願 2 0 0 3 - 1 0 1 3 4 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 3 7 6]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 0 日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号
氏 名 オリnpas 光学工業株式会社
2. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由] 名称変更
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号
氏 名 オリnpas 株式会社